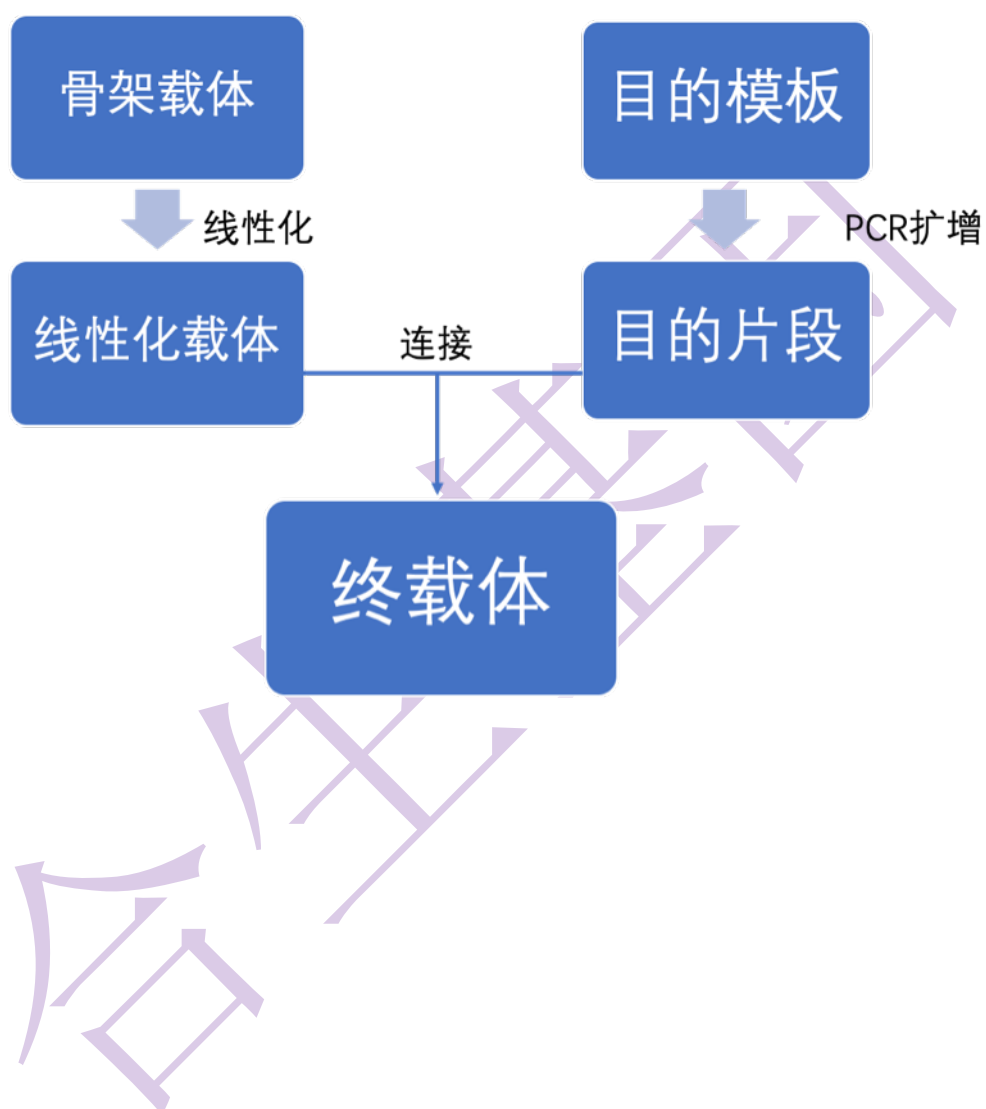


干扰腺相关病毒载体构建 手册

1. 服务流程	2
2. 仪器与试剂	3
3. 构建实例	4
3.1. 基因干扰腺相关病毒载体构建 :	4
3.1.1. 目的基因	4
3.1.2. 载体信息	4
3.1.3. 干扰载体图谱 (NC 序列)	4
3.2. 质粒构建步骤	5
3.2.1. RNA 靶点设计	5
3.2.2. 载体酶切	5
3.2.3. 目的序列合成及退火	5
3.2.4. 退火产物与载体进行连接	5
3.2.5. 转化涂板	6
3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取	6
3.2.7. 质粒质控 (目的基因测序)	6
3.2.8. 测序引物	7

1. 服务流程



2. 仪器与试剂

表 1 主要仪器及生产商

仪器名称	生产厂家
Sorvall Legend Mircro 17 台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
实验室耗材 I (移液枪头、1.5/2.0 mL 离心管)	美国 Axygen 公司
实验室耗材 II (细胞培养皿、移液管等)	美国 Corning 公司
凝胶成像分析系统	北京赛智创业科技有限公司
凝胶电泳系统	美国 BioRad 公司

表 2 主要试剂及生产商

试剂名称	生产厂家
质粒小量快速提取试剂盒 (离心柱型)	北京艾德莱生物科技有限公司
限制性内切酶类	美国 NEB 公司/ ThermoFisher 公司
DNA Ligase	北京合生基因科技有限公司

3. 构建实例

以 RNAi 阴性对照靶点序列为例描述载体构建。

3.1. 基因干扰腺相关病毒载体构建：

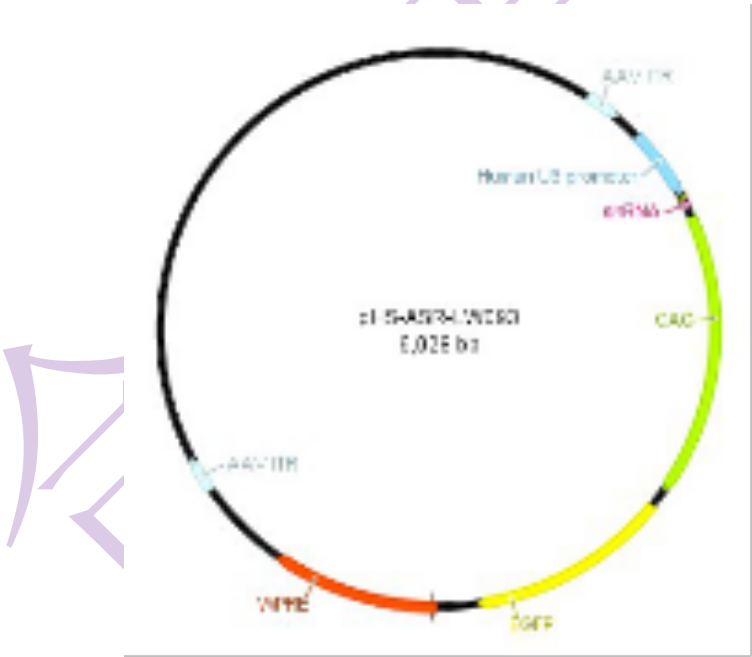
3.1.1. 目的基因

NC 序列

3.1.2. 载体信息

载体编号	载体元件	原核抗性
XX	AAV-U6-shRNA-CAG-EGFP	AMP

3.1.3. 干扰载体图谱（NC 序列）



干扰腺相关病毒载体示例

3.2. 质粒构建步骤

3.2.1. RNA 靶点设计

针对目的基因序列，遵循 RNAi 靶点设计原则，设计多个 RNAi 靶点序列，选择最优靶点构建目的载体。除了针对目的基因的靶点序列外，我们也使用一些无义序列作为 RNAi 阴性对照。另外，RNAi 靶点序列也可由客户提供，根据客户的需求构建在相应的载体上。

3.2.2. 载体酶切

酶切骨架载体，对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带：

酶切体系：

10x buffer	2 μ L
酶 1	1 μ L
酶 2	1 μ L
Plasmid/product	2~3 μ L
Add ddH ₂ O to	20 μ L

3.2.3. 目的序列合成及退火

根据目的序列及骨架载体序列，设计引物序列；先合成单链引物序列，然后退火成双链 DNA。

ddH ₂ O	14 μ L
10×Buffer	2 μ L
100 μ M 正向引物	2 μ L
100 μ M 反向引物	2 μ L

反应程序为：95 $^{\circ}$ C 3 min，95 $^{\circ}$ C 到 25 $^{\circ}$ C 缓慢冷却，例如 -1 $^{\circ}$ C/ 30 s

3.2.4. 退火产物与载体进行连接

退火产物	1 μ L
------	-----------

骨架载体	1 μ L
1×Buffer	5 μ L
ddH ₂ O	2 μ L

3.2.5. 转化涂板

连接后产物 10 μ L 转化至 100 μ L 感受态 ,42℃金属浴 热激 1 min, 冰上迅速预冷 2 min , 在超净工作台中 , 加入 600 μ L 无抗培养基 , 37℃ 摇床振荡培养 1 h , 取适量菌液涂布在含有相应抗生素的平板上 , 在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

3.2.6. 阳性克隆摇菌及质粒提取

挑选 3-4 个单菌落摇菌 , 加入相应抗性培养基摇菌过夜 (8 mL LB 液体培养基) , 然后参照质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。

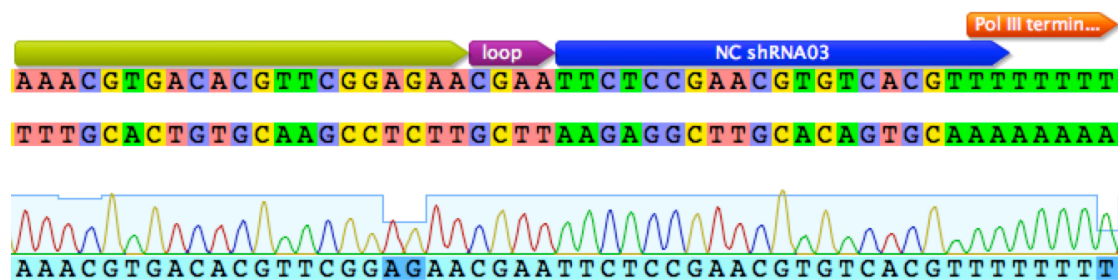
3.2.7. 质粒质控 (目的基因测序)

完成干扰腺相关病毒质粒构建后 , 针对目的基因序列测序 , 并比对鉴定 , 以获得构建正确的质粒。

基因干扰腺相关病毒载体信息

载体编号	载体内容	shRNA 序列
NC	NC shRNA	5' -AAACGTGACACGTTTCGGAGAACGAA TTCTCCGAACGTGTCACGTTT -3'

NC 载体测序结果 :



基因干扰腺相关病毒质粒测序比对结果

3.2.8. 测序引物

引物名称	序列
NC 质粒	CAGGAAGAGGGCCTATTTC